前列腺小体 miRNA-146a/TLR-4/NF-κB 通路在 EAP 大鼠慢性炎症中的作用及大火草干预的研究

陆良喜，史宏，黄志敏，等.[J]. 中国全科医学，2022. [Epub ahead of print]. DOI：10.12114/j.issn.1007-9572.2022.0731.

陆良喜 [1]，史宏 [1]，黄志敏 [2]，王文杰 [1]，邹涵 [3]，张知英 [3]，吴金玉 [2*]

基金项目：广西自然科学基金(2020GXNSFBA297101)
1.530001 广西壮族自治区南宁市，广西中医药大学第一附属医院仁爱分院男科　2.530023 广西壮族自治区南宁市，广西中医药大学第一临床医学院、广西中医药防治医学分子生物重点实验室　3. 530001 广西壮族自治区南宁市，广西中医药大学研究生院
*通信作者：吴金玉，教授、主任医师，E-mail：wujinyu0109@ sina.com

摘要 背景 目前对慢性前列腺炎（CP）的治疗未达到预期的疗效，亟需寻找新的治疗药物，课题组前期的临床观察发现大火草对 CP 有较好的疗效，但具体的作用机制还有待进一步研究。**目的** 探讨前列腺小体源性 miRNA-146a 调控 TLR-4/NF-κB 通路在 EAP 大鼠慢性炎症中的作用及大火草干预的可能机制。**方法** 将 42 只 Wistar 大鼠随机数字表法分为 7 组，即正常组、模型组、激动剂组、抑制剂组、大火草低剂量组、大火草中剂量组、大火草高剂量组，每组 6 只。药物干预后，采用 RT-PCR 检测前列腺小体 miRNA-146a-5p mRNA，WB 法检测 TLR-4、IκB、p-IκB、TRAF6 蛋白，ELISA 法检测炎症因子。**结果** 与正常组比较，各组前列腺小体 miRNA-146a-5p mRNA 表达均下调（P<0.01）。与模型组比较，大火草中、高剂量组，miRNA-146a mimics 组前列腺小体 miRNA-146a-5p mRNA 表达均上调（P<0.01）；miRNA-146a inhibitor 组前列腺小体 miRNA-146a-5p mRNA 表达下调（P<0.01）。大火草和 miRNA-146a mimics 可以显著降低前列腺组织 TLR-4、p-IκBα、TRAF6 蛋白表达(P<0.01)；促进前列腺组织 IκBα 蛋白表达上调(P<0.01)；还可以显著降低大鼠血清中 TNF-α、IL-6、IL-8、INF-γ 水平（P<0.01）。大火草和 miRNA-146a mimics 可以减轻前列腺组织炎细胞浸润，改善前列腺组织病理损伤。**结论** 前列腺小体源性 miRNA-146a 可以调节 TLR-4/NF-κB 通路活化参与 EAP 大鼠前列腺局部病理变化。大火草抗 EAP 大鼠慢性炎症的作用机制可能与其调控前列腺小体源性 miRNA-146a/TLR-4/NF-κB 通路有关。

关键词 慢性前列腺炎；前列腺小体；微小 RNA-146a；Toll 样受体 4；核转录因子-κB
ORCID：0000-0002-1617-2662

Study on the Role of Prostasome Derived miR-146a/TLR-4/NF-κB Pathway in Chronic Inflammation in EAP Rats and Mechanism of Anemone Tomentosa in Treating EAP Rats

LU Liangxi[1], SHI Hong[1],HUANG Zhimin[2],WANG Wenjie[1],ZOU Han[3],ZHANG Zhiying[3],WU Jinyu[2*]
1.Department of Andrology, Ren 'ai Branch of the First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine,Nanning 530001,China.
2.First School of Clinical Medical, Guangxi University of Chinese Medicine,Guangxi Key Laboratory of Moleculai Biology of Preventive Medicine of Traditional Chinese Medicine,Nanning 530023,China
3.Department of Graduate School, Guangxi University of Chinese Medicine,Nanning 530001,China
*Corresponding author：WU Jinyu,professor,Chief physician; E-mail：wujinyu0109@ sina.com

【Abstract】 **Background** At present, the treatment of chronic prostatitis (CP) has not achieved the expected efficacy, so it is urgent to find new treatment drugs. The preliminary clinical observation of the research group found that Anemone Tomentosa has a good effect on chronic prostatitis, but the specific mechanism of action remains to be further studied. **Objectives** To investigate the role of prostasome derived miRNA-146a in regulating TLR-4/NF-κB pathway in chronic inflammation in EAP rats and the mechanism of Anemone Tomentosa in treating EAP rats. **Methods** Forty-two Wistar rats were divided into 7 groups by random number table method, including normal group, model group, mimics group, inhibitor group, low-dose of anemone tomentosa group, medium-dose of anemone tomentosa group and high-dose of anemone tomentosa group, with 6 rats in each group. After drug intervention, miRNA-146a-5p mRNA in prostasome will be detected by RT-PCR, and TLR-4, IκB, p-IκB and TRAF6 protein will be detected by WB, and inflammatory cytokines include TNF-α, IL-6, IL-8, and INF-γ will be detected by ELISA. **Results** Compared with normal group, miRNA-146a-5p mRNAs expression in prostasome were down-regulated in each group (P<0.01). Compared with model group, miRNA-146a-5p mRNAs expression in prostasome were up-regulated in medium-dose group, high-dose group, and mimics group (P<0.01), and were down-regulated in inhibitor group(P<0.01). The expression of TLR-4, p-IκBα and TRAF6 proteins in prostate tissues of EAP rats were significantly down-regulated in anemone tomentosa and mimics groups (P<0.01). The expression of IκBα proteins in prostate tissues of EAP rats

were significantly up-regulated in anemone tomentosa and mimics groups($P<0.01$). The serum levels of TNF-α, IL-6, IL-8 and INF-γ in EAP rats were significantly down--regulated in anemone tomentosa and mimics groups($P<0.01$). Anemone tomentosa and miRNA-146a mimics significantly reduced the inflammatory cell infiltration of prostate tissue and improved the pathological injury of prostate tissue. **Conclusion** Prostasome derived miRNA-146a can regulate the activation of TLR-4/NF-κB pathway participate in local pathological changes of prostate in EAP rats. The mechanism of the anemone tomentosa inhibiting chronic inflammation in EAP rats may be related to the regulation of prostasome derived miRNA-146a/TLR-4/NF-κB pathway.

【Key words】Chronic prostatitis; Prostasome; miRNA-146a; TLR-4; NF-κB

慢性前列腺炎/慢性盆腔疼痛综合征（chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome，CP/CPPS）是泌尿外科、男科常见的疾病之一，与细菌感染没有明确的联系，以前列腺炎症状态和慢性疼痛障碍为主要征象，占前列腺炎比例的 90-95%[1]。CP/CPPS 涉及复杂的病理生理机制，包括隐性感染、免疫、炎症、神经、内分泌、前列腺内尿反流、氧化应激和心理因素等，且不同因素之间经常交叉影响[2]。由于其病因不明且复杂，单模式治疗在很大程度上是不成功的。因此，CP/CPPS 已经过渡到多模式的治疗方法，包括药物和非药物治疗。药物疗法主要包括抗生素、α 受体阻滞剂、消炎药、植物疗法等；非药物治疗包括盆底物理治疗、肌筋膜触发点释放、针灸、心理支持、电身体冲击波治疗、局部热疗等[3]。然而，一项系统回顾和荟萃分析研究表明，现代医学目前仍然无法明确其具体的发病机制，而且对于 CP/CPPS 的管理和治疗未达到预期的疗效[4]。近年来，在 CP/CPPS 的替代疗法中，以草药部位或提取物为形式的中草药因其对前列腺疾病的积极作用而受到关注，显示出其特色优势[5]。我们前期研究发现大火草能显著改善 CP 患者临床症状[6]、调节 CP 模型大鼠炎症因子水平[7]，从而发挥抗前列腺炎的作用。

人类前列腺上皮细胞分泌的前列腺小体是第一个被确定的生殖道膜性囊泡，属于外泌体。前列腺小体的生理病理作用在前列腺疾病中发挥重要作用。基于此，本文采用自身免疫性前列腺炎（experimental autoimmune prostatitis，EAP）模型大鼠，探讨前列腺小体来源的微小 RNA-146a（microRNA-146a，miRNA-146a）/Toll 样受体 4（Toll like receptor 4，TLR4）/核转录因子-κB（Nuclear transcription factors-κB，NFκB）通路在 EAP 大鼠前列腺局部慢性炎症中的作用，并给予大火草干预治疗，探讨集“清热祛湿、利尿通淋、益气补肾”功效于一身的单味中药治疗 CP/CPPS 的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

取 42 只体质量（200±15）g 的 8 周龄清洁级 Wistar 雄性大鼠，购自长沙市天勤生物技术有限公司，许可证号：SCXK2019-0013。在广西中医药防治医学分子生物重点实验室饲养，保持室温 18～25℃，全价营养、分笼饲养。

1.2 主要的仪器、试剂

透射电子显微镜（HITACHI，HT7800/HT7700），核酸蛋白定量仪（denovix，DS-11），电泳仪（北京六一公司，DYCZ-24DN 型），半干转膜仪系统（ATTO，WSE-4040、AE6675L），荧光定量 PCR 仪（BIO-RAD，CFX Connect™），生物分光光度计（Eppendorf，BioPhotometer），光学显微镜（OLYMPUS，BX43），超速离心机（Hitachi，CP100MX），酶标仪（BIO-TEK，Elx800）。TLR4 抗体（Affinity，AF7017），肿瘤坏死因子受体相关因子 6（tumor necrosis factor receptor-associated factor 6，TRAF6）抗体（Affinity，AF5376），p-IκBα 抗体（Affinity，AF5002），IκBα 抗体（Affinity，AF2002）。miRcute miRNA isolation kit 试剂盒（天根生物科技有限公司，Cat# DP501），miRcute miRNA Detection Kit（SYBR Green）试剂盒（天根生物科技有限公司，Cat# FP411），miRcute miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒（天根生物科技有限公司，Cat# KR211）。完全弗氏佐剂（Sigma-aldrich），miRNA-146a mimics（吉玛基因），miRNA-146a inhibitor（吉玛基因）。白介素-6（interleukin-6，IL-6）（联科生物，EK306），IL-8（联科生物，SEKR-0014），干扰素-γ（interferon-γ，IFN-γ）（联科生物，EK380），肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor，TNF-α）（联科生物，EK382）。

1.3 大火草煎剂制备

适量大火草置于煎煮容器内，加相当于药材量 5-8 倍的冷水浸泡 1h，煮沸 30min，滤过；药渣加 3-6 倍量水继续煎煮，煮沸 30min，滤过。合并两次煎出药液，5000r/min 离心 10min，取上清液，利用旋转蒸发器在水浴上浓缩至每毫升含生药量 5.84g。灌胃前用蒸馏水配至浓度为 1.46g/mL，相当于人和动物间按体表面积折算的等效剂量的 1 倍。

1.4 EAP 大鼠模型制备

大鼠前列腺蛋白提纯液的制作[8]：5 只体质量（400±20）g 的 4 月龄 SPF 级 Wistar 雄性大鼠处死后，消毒放在超净台上，从下腹部逐层剪开，并暴露前列腺后剪下，用冷盐水洗净，并且剪碎前列腺组织，加入含 0.5% TritonX-100 等重的生理盐水溶液（预先高温灭菌）制成匀浆，将匀浆液置入高速离心机中以 15 000r/min 离心 30 min，过程保持低温（4℃），取上清液 0.2 mL，等比稀释后用酶标仪测浓度。取余下的上清液加入 0.1M pH7.2 的 PBS 缓冲液把蛋白提纯液稀释成 60 g/L 的浓度，放入冷冻管保存备用（-80℃）。

免疫造模[8]：42 只体质量（200±15）g 的 8 周龄雄性 Wistar 大鼠随机数字表法分为 7 组，即正常组（A 组）、模型组（B 组）、大火草低剂量组（C 组）、大火草中剂量组（D 组）、大火草高剂量组（E 组）、miRNA-146a inhibitor

组（F 组）、miRNA-146a mimics 组（G 组），每组 6 只。除正常对照组外，其他各组分别于第 0、30 天，在大鼠多处皮下注入大鼠前列腺蛋白提纯液与弗氏完全佐剂等比混匀的混悬液 1mL，同时腹腔注射百白破疫苗 0.5 mL。

1.5 分组给药

造模成功后，正常组与模型组给予生理盐水(4ml/kg •d)灌胃;大火草低、中、高剂量组予浓度 1.46g/mL、2.92g/mL、5.84g/mL 大火草煎液（4ml/kg • d）灌胃。以上给药每天一次，连续给药 4 周。miRNA-146a mimics 组，给予生理盐水(4ml/kg •d)灌胃 4 周，并于实验取材前 72h 鼠尾静脉内注射 miRNA-146a mimics(0.2μL/g);miRNA-146a inhibitor 组，给予生理盐水（4ml/kg •d）灌胃 4 周，并于实验取材前 72h 鼠尾静脉内注射 miRNA-146a inhibitor（0.2μL/g）。[9]

1.6 检测指标

1.6.1 前列腺组织病理 HE 染色观察

福尔马林固定好前列腺组织，石蜡包埋，切片，苏木素染液-伊红染液染色后，封片，在光学显微镜下观察前列腺组织病理改变。

1.6.2 前列腺液中前列腺小体电镜鉴定

采用超速离心法提取前列腺液中前列腺小体，吸取样品 10μL 滴加于铜网上沉淀 1 min，滤纸吸去浮液；醋酸双氧铀 10 μL 滴加于铜网上沉淀 1 min，滤纸吸去浮液；常温干燥数分钟后，以备透射电镜下观察。

1.6.3 前列腺小体 miRNA-146a-5p mRNA 表达的检测

采用超速离心法提取前列腺小体，吸取样品 200μL，加入等体积裂解液 MZ，按照 miRcute miRNA isolation kit 试剂盒说明书提取总 RNA，参照 miRcute miRNA Detection Kit（SYBR Green）试剂盒说明书操作进行反转录（反应条件，37℃、60min，37℃、60min）。RT-PCR 仪扩增，以 U6 作内参对照，采用 $2^{-\triangle\triangle CT}$ 法进行数据的相对定量分析。PCR 反应条件：94℃预变性 2min，1 个循环，94℃变性 20s，40 个循环，60℃退火 34s，40 个循环。

1.6.4 前列腺组织 TLR-4、IκB、p-IκB、TRAF6 蛋白表达的检测

取 50mg 前列腺组织剪碎后于液氮中研磨至细粉末状，分装于离心管中，加入 500ul 的 RIPA 裂解液，提取总蛋白。按操 Western Blot 作步骤进行电泳、转膜，进行 TLR4 抗体（1:1000），TRAF6 抗体（1:1000），p-IκBα 抗体（1:1000），IκBα （1:1200）免疫检测，成像仪中曝光、拍照。蛋白表达量=目的蛋白灰度值/内参灰度值。

1.6.5 ELISA 法检测大鼠血清 TNF-α、IL-6、IL-8、IFN-γ 水平

严格按照 ELISA 试剂盒测定血清中 TNF-α、IL-6、IL-8、IFN-γ 浓度。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件作统计分析，结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。服从正态分布并且方差齐性检验同的两个样本均数用 t 检验比较，单因素方差分析用于多组间比较，事后检验采用 LSD；不服从正态分布的两样本均数比较行非参数检验。结果以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2. 结果

2.1 各组大鼠前列腺组织病理观察分析

光学显微镜下观察，与正常组比较，模型组前列腺组织形态损伤严重，腺腔形状极其不规则，变形严重；部分腺泡上皮细胞胞核固缩，坏死；腺泡间质出血严重，有轻度炎细胞浸润。与模型组比较，激动剂组前列腺组织结构轻度损伤，腺体结构略显紊乱；部分前列腺上皮细胞坏死，脱落；无明显炎细胞浸润；抑制剂组前列腺组织结构损伤严重，腺体结构紊乱，腺腔区域变小，部分上皮细胞脱落至管腔；间质有大量红细胞，少量炎细胞浸润。大火草低剂量组前列腺组织结构有较明显损伤，腺体结构紊乱，腺腔形态不规则，部分上皮细胞坏死；腺泡间质结缔组织有明显出血及中度炎细胞浸润；大火草中剂量组前列腺组织有较明显损伤，腺体结构紊乱，腺腔形态不规则、变小；腺泡间质少量炎细胞浸润；高剂量组前列腺组织有轻度损伤，大部分腺泡上皮细胞排列整齐，腺腔形状规则，少量上皮细胞增生；腺泡间质有疏松的结缔组织，其间有成纤维细胞等，无炎细胞浸润。如图 1 所示。

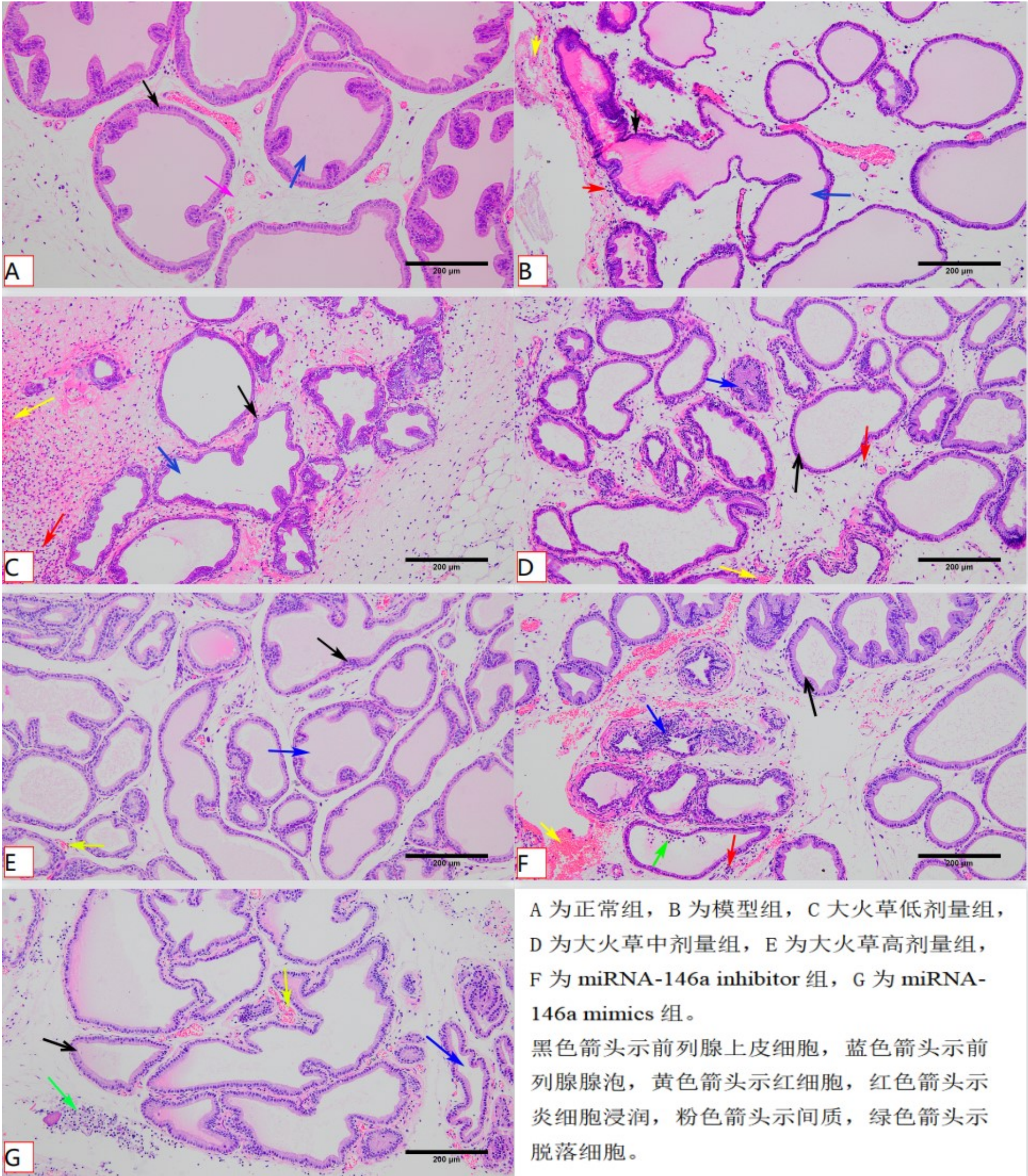


图 1　大火草对 EAP 大鼠前列腺组织病理的影响（HE×100）

Figure 1　Effects of anemone tomentosa on prostate tissues histopathology of EAP rats

2.2 各组大鼠前列腺液中前列腺小体电镜鉴定

前列腺小体直径约为 30~150 nm 的膜性囊泡，电镜下可观察到典型的“杯盘”形态。电镜结果表明各组大鼠前列腺液中均提取到前列腺小体。如图 2 所示。

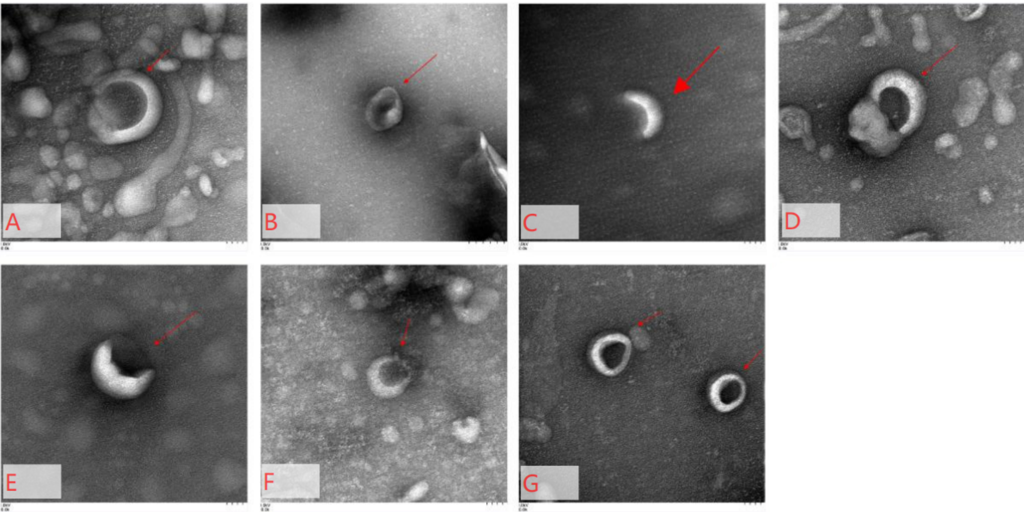


图 2　各组大鼠前列腺液提取的前列腺小体电镜鉴定结果(100 kv)

Figure 2　Electron microscopic identification results of prostasome extracted from prostatic fluid of rats in each group

2.3 各组大鼠前列腺小体 miRNA-146a-5p mRNA 表达的结果分析

研究结果提示，与正常组比较，各组前列腺小体 miRNA-146a-5p mRNA 表达均下调（P<0.01）。与模型组比较，大火草中、高剂量组，miRNA-146a mimics 组前列腺小体 miRNA-146a-5p mRNA 表达均上调（P<0.01）；miRNA-146a inhibitor 组前列腺小体 miRNA-146a-5p mRNA 表达下调（P<0.01）。详见表 2。

表 1　RT-PCR 检测引物设计

Table 1　Design of primer sequence for RT-PCR detection

基因	引物
miRNA-146a-5p	5’-TGAGAACTGAATTCCATGGGTT-3’
U6	5’-CGCAAGGATGACACGCAAAT-3’

表 2　各组大鼠前列腺小体 miRNA-164a-5p 表达比较分析($\bar{x}$±S，n=6）

Table 2　Comparative analysis of miRNA-146a-5p expression in prostasome of rats in each group

组别	miRNA-164a-5p
A 组	1.123±0.139
B 组	0.439±0.116$^{\triangle\triangle}$
C 组	0.535±0.118$^{\triangle\triangle}$
D 组	0.724±0.105$^{\triangle\triangle\blacktriangle\blacktriangle}$
E 组	0.747±0.116$^{\triangle\triangle\blacktriangle\blacktriangle}$
F 组	0.212±0.028$^{\triangle\triangle\blacktriangle\blacktriangle}$
G 组	0.848±0.092$^{\triangle\triangle\blacktriangle\blacktriangle}$
F 值	45.826
P 值	0.000

注：与 A 组比较，P$^{\triangle}$ <0.05，P$^{\triangle\triangle}$<0.01；与 B 组比较，P$^{\blacktriangle}$<0.05，P$^{\blacktriangle\blacktriangle}$<0.01，有统计意义。

2.4 各组大鼠前列腺组织 TLR-4、IκBα、p-IκBα、TRAF6 蛋白表达的结果分析

研究结果提示，与正常组比较，大火草高剂量组前列腺组织 TLR-4 蛋白表达最接近正常组（P>0.05），其余各组前列腺组织 TLR-4 蛋白表达均上调（P<0.01）。与模型组比较，miRNA-146a mimics 组、大火草低中高剂量组前列腺组织 TLR-4 蛋白表达均降低(P<0.01)，且大火草高剂量组降低最显著；miRNA-146a inhibitor 组升高(P<0.05)。与正常组比较，各组前列腺组织 p-IκBα 蛋白表达均上调（P<0.01）。与模型组比较，miRNA-146a mimics 组、大火草低中高剂量组前列腺组织 p-IκBα 蛋白表达均降低（P<0.01），且大火草高剂量组降低最显著；miRNA-146a inhibitor 组升高（P<0.01）。与正常组比较，miRNA-146a mimics 组、大火草高剂量组前列腺组织 IκBα 蛋白表达接近正常组(P>0.05),其余各组前列腺组织 IκBα 蛋白表达均下调(P<0.01 或 P<0.05)。与模型组比较,miRNA-146a mimics 组、大火草高剂量组前列腺组织 IκBα 蛋白表达均上调（P<0.01）。与正常组比较，各组前列腺组织 TRAF6 蛋白表达均上调（P<0.01 或 P<0.05）。与模型组比较，miRNA-146a mimics 组、大火草低中高剂量组前列腺组织 TRAF6 蛋白表达均降低（P<0.01），且大火草高剂量组降低最显著；miRNA-146a inhibitor 组 TRAF6 蛋白表达有升高趋势，

无统计学意义。详见表 3，图 3。

表 3　各组大鼠前列腺组织蛋白表达比较分析($\bar{x}\pm S$，n=6)

Table 3　Comparative analysis of protein expression of TLR-4,IκBα,p-IκBα and TRAF6 in prostate tissues of rats in each group

组别	TLR4	p-IκBa	IκBa	TRAF6
A 组	0.225±0.035	0.342±0.043	0.599±0.013	0.494±0.034
B 组	0.787±0.100$^{\Delta\Delta}$	1.033±0.079$^{\Delta\Delta}$	0.410±0.075$^{\Delta\Delta}$	1.158±0.056$^{\Delta\Delta}$
C 组	0.552±0.060$^{\Delta\Delta\blacktriangle\blacktriangle}$	0.777±0.051$^{\Delta\Delta\blacktriangle\blacktriangle}$	0.442±0.051$^{\Delta}$	0.893±0.119$^{\Delta\Delta\blacktriangle\blacktriangle}$
D 组	0.383±0.035$^{\Delta\Delta\blacktriangle\blacktriangle}$	0.576±0.033$^{\Delta\Delta\blacktriangle\blacktriangle}$	0.468±0.093$^{\Delta}$	0.725±0.166$^{\Delta\blacktriangle\blacktriangle}$
E 组	0.288±0.026$^{\blacktriangle\blacktriangle}$	0.456±0.034$^{\Delta\Delta\blacktriangle\blacktriangle}$	0.555±0.044$^{\blacktriangle\blacktriangle}$	0.655±0.088$^{\Delta\blacktriangle\blacktriangle}$
F 组	0.931±0.125$^{\Delta\Delta\blacktriangle}$	1.179±0.079$^{\Delta\Delta\blacktriangle\blacktriangle}$	0.379±0.087$^{\Delta\Delta}$	1.243±0.163$^{\Delta\Delta}$
G 组	0.394±0.081$^{\Delta\Delta\blacktriangle\blacktriangle}$	0.816±0.042$^{\Delta\Delta\blacktriangle\blacktriangle}$	0.575±0.102$^{\blacktriangle\blacktriangle}$	0.861±0.094$^{\Delta\Delta\blacktriangle\blacktriangle}$
F 值	74.802	184.408	8.494	33.821
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注：与 A 组比较，P^{Δ} <0.05，$P^{\Delta\Delta}$<0.01；与 B 组比较，$P^{\blacktriangle}$<0.05，$P^{\blacktriangle\blacktriangle}$<0.01，有统计意义。

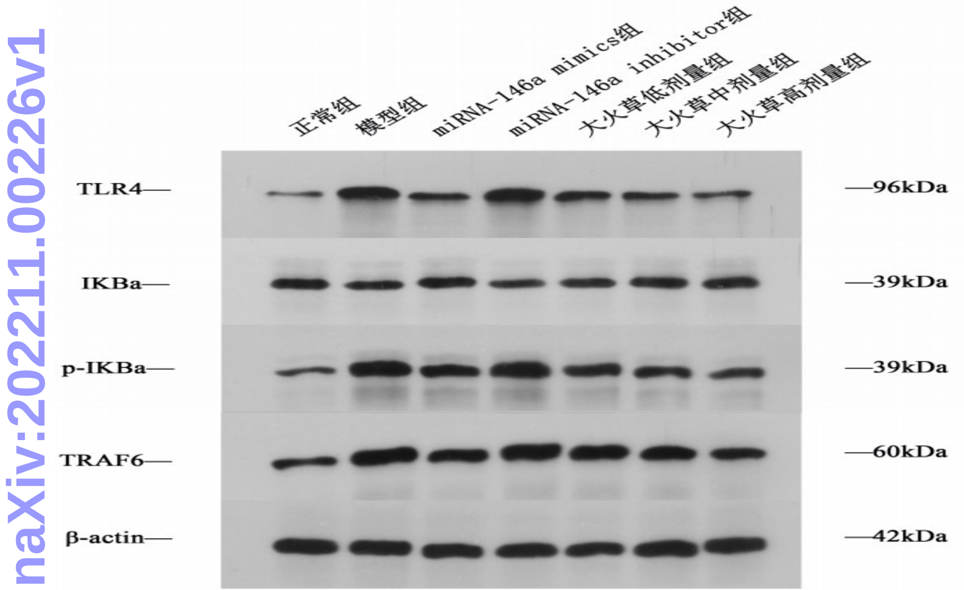


图 3 各组大鼠前列腺组织 TLR-4、IκBa、p-IκBα、TRAF6 蛋白表达

Figure 3 protein expression of TLR-4,IκBα,p-IκBα and TRAF6 in prostate tissues of rats in each group

2.5 各组大鼠血清 TNF-α、IL-6、IL-8、IFN-γ 水平分析

研究结果提示，与正常组比较，除大火草高剂量组外，其余各组大鼠血清 TNFα 水平均显著升高（P<0.01）；与模型组比较，除 miRNA-146a inhibitor 组外，其余各组大鼠血清 TNFα 水平均显著降低（P<0.01）。与正常组比较，除大火草高剂量组外，其余各组大鼠血清 IL-6 含量均显著升高（P<0.01）；与模型组比较，大火草低中高剂量组和 miRNA-146a mimics 组显著降低 IL-6 水平（P<0.01）。与正常组比较，除大火草高剂量组外，其余各组大鼠血清 IL-8 水平均升高，有统计学意义（P<0.01）；与模型组比较，除 miRNA-146a inhibitor 组外，其余各组大鼠血清 IL-8 水平均显著降低（P<0.01）。与正常组比较，各组大鼠血清 INF-γ 水平均显著升高（P<0.01 或 P<0.05）；与模型组比较，除 miRNA-146a inhibitor 组外，其余各组 INF-γ 水平显著降低（P<0.01）

表 4　各组大鼠血清 TNFα、IL-6、IL-8 及 INF-γ 水平比较分析($\bar{x}\pm S$，n=6)

Table 4　Comparative analysis of TNFα,IL-6,IL-8 and INF-γ in serum of rats in each group

组别	TNFα	IL-6	IL-8	INF-γ

A 组	20.473±1.891	77.897±5.967	25.491±1.886	34.566±6.379
B 组	58.851±6.991$^{\Delta\Delta}$	167.439±17.913$^{\Delta\Delta}$	55.744±6.726$^{\Delta\Delta}$	84.312±9.470$^{\Delta\Delta}$
C 组	47.247±5.914$^{\Delta\Delta\blacktriangle\blacktriangle}$	140.326±17.663$^{\Delta\Delta\blacktriangle\blacktriangle}$	44.726±6.803$^{\Delta\Delta\blacktriangle\blacktriangle}$	71.388±7.438$^{\Delta\Delta\blacktriangle\blacktriangle}$
D 组	37.793±5.017$^{\Delta\Delta\blacktriangle\blacktriangle}$	123.284±14.446$^{\Delta\Delta\blacktriangle\blacktriangle}$	38.329±3.305$^{\Delta\Delta\blacktriangle\blacktriangle}$	60.698±6.885$^{\Delta\Delta\blacktriangle\blacktriangle}$
E 组	24.994±3.490$^{\blacktriangle\blacktriangle}$	85.925±7.733$^{\blacktriangle\blacktriangle}$	30.482±3.813$^{\blacktriangle\blacktriangle}$	44.589±4.616$^{\Delta\blacktriangle\blacktriangle}$
F 组	64.084±7.110$^{\Delta\Delta}$	176.452±22.310$^{\Delta\Delta}$	65.151±6.715$^{\Delta\Delta\blacktriangle\blacktriangle}$	93.779±9.689$^{\Delta\Delta\blacktriangle}$
G 组	31.618±3.749$^{\Delta\Delta\blacktriangle\blacktriangle}$	105.578±16.281$^{\Delta\Delta\blacktriangle\blacktriangle}$	35.114±7.191$^{\Delta\Delta\blacktriangle\blacktriangle}$	56.866±8.626$^{\Delta\Delta\blacktriangle\blacktriangle}$
F 值	61.574	36.275	38.593	44.068
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注：与 A 组比较，$P^{\Delta}<0.05$，$P^{\Delta\Delta}<0.01$；与 B 组比较，$P^{\blacktriangle}<0.05$，$P^{\blacktriangle\blacktriangle}<0.01$，有统计意义。

3.讨论

CP/CPPS 症状包括不同程度的慢性盆腔疼痛（前列腺、会阴、尿道）和排尿功能障碍，可显著影响患者的生活质量。据估计中国男性人群中 CP/CPPS 的患病率约为 8.4~25%[10]，并且随着年龄的增长其复发率上升到 50%[11]。根据一项基于循证医学的系统性综述表明[12]，可能轻微减轻 CP/CPPS 症状的主要疗法是：植物疗法、α-阻滞剂、消炎药和抗生素，循证医学证据质量中低，说明目前治疗手段的疗效往往不满意。CP/CPPS 的病因多变、机制复杂导致了其高发病率、难治性、复发性是 CP/CPPS 的主要特点。中草药治疗作为一种有效的替代治疗方法已被广泛应用于 CP/CPPS 的管理，并因其副作用小和多模态效应而引起了研究人员和临床医生的关注[5]。中医学没有明确的 CP/CPPS 相对应病名。医家普遍认为本病本虚标实的病变本质，并认为其发病与“肾虚、湿热、瘀阻”有关[13]。大火草系毛茛科银莲花属多年生草本植物。主要分布于广西、云南等地区，可以说是地道壮药。性味辛微苦、平，有“清热祛湿、利尿通淋、益气补肾”的功效[14]。大火草的功效与 CP/CPPS“肾虚湿热”的基本病机高度切合。

miRNA 是一类具有多重功能的非编码 RNA，能够在转录后水平调控基因的表达。TLR 选择性识别病原相关分子模式，构成免疫系统的第一道防线，其信号通路过度激活会导致炎症和相关免疫性疾病的发生，miRNA 可以精细调节 TLRs 信号通路起始、终止、反应强度，参与免疫炎症的发生发展[15]。TRAF6 具有增强促炎性细胞因子基因转录，从而启动炎症级联反应的生物作用，是 TNF 超家族和 TLR 受体超家族的重要结合蛋白[16]。TRAF6 可通过激活 IκB 激酶，促进 IκB 磷酸化及其降解，从而激活 NFκB 信号通路，是具有正性调节和特异性调控 NFκB 信号转导的关键因子[17]。已有报道证实 miR-146a 通过靶向 TRAF6 在炎症中发挥作用。研究表明 miRNA-146a 通过抑制 TLR-4/NFκB 通路的关键分子 TRAF6 的表达，来抑制 NK-κB 的转录活性，并降低其下游炎症因子 IL-1β、IL-6、IL-8 和 TNF-α 的释放，最终起到抑制炎症反应的作用[18]。杨永祥等[19]研究外泌体源性 miR-146a 在 N9 型小胶质细胞内表达升高，并通过调控 TLR4 信号通路中 TRAF6 分子的表达负反馈抑制 N9 型小胶质细胞介导的炎性反应，明显降低干扰素-β（interferon-β，IFN-β）、TNF-α、IL-1β 的表达水平。

本研究探讨了 EAP 大鼠前列腺小体源性的 miRNA-146a 对 TLR-4/NF-κB 通路的调控作用，结果表明 miRNA-146a 可以通过抑制 TRAF6 的表达，来抑制 TLR-4、NK-κB 的转录活性，抑制 NFκB 过度磷酸化，并降低其下游炎症因子 IL-6、IL-8、IFN-γ 和 TNF-α 的释放，减轻前列腺局部炎症反应。通过大火草干预后，可以促进前列腺小体源性 miRNA-146a-5p mRNA 的表达，从而抑制 TRAF6 的表达，进而抑制 TLR-4/NK-κB 通路活化，降其下游炎症因子的释放，减轻前列腺局部炎症反应。随着大火草剂量浓度增加，对前列腺小体源性 miRNA-146a/ TLR-4/NK-κB 通路调控越显著。本实验研究样本例数较少，实验结果初步论证了前列腺小体在 CP 发生、发展中具有较好的潜在研究价值，可以作为未来研究的新方向。

本文无利益冲突。

参考文献

[1]Franco JV, Turk T, Jung JH, et al. Pharmacological interventions for treating chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome[J].Cochrane Database Syst Rev,2019,10(10):CD012552. DOI: 10.1002/14651858.CD012552. pub2. Online ahead of print.

[2]Franco JVA, Turk T, Jung JH, et al. Pharmacological interventions for treating chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome:a Cochrane systematic review[J]. BJU Int,2020,125(4):490-496.DOI: 10.1111/bju.14988.

[3]Pena VN, Engel N, Gabrielson AT, et al. Diagnostic and Management Strategies for Patients with Chronic Prostatitis and Chronic Pelvic Pain Syndromee [J].Drugs Aging,2021,38(10):845-886. DOI: 10.1007/s40266- 021-00890-2.

[4]Xue Y, Duan Y, Gong X, et al. Traditional Chinese medicine on treating chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome: A systematic review and meta-analysis[J].Medicine(Baltimore),2019,98(26):e16136.DOI: 10. 1097/MD.0000000000016136.

[5]Dashdondov O, Wazir J, Sukhbaatar G, et al. Herbal nutraceutical treatment of chronic prostatitis-chronic pelvic pain syndrome: a literature review[J].Int Urol Nephrol,2021,53(8):1515-1528.DOI:10.1007/s11255-021-028 68-w.

[6]陆良喜，吴金玉，黄志敏，等.壮药大火草保留灌肠治疗慢性前列腺炎 60 例临床观察[J].湖南中医杂志，2019，35(06):55-56.DOI:10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2019.06.024.
LU LX, WU JY, HUANG ZM, et al.Clinical observation on 60 cases of chronic prostatitis treated by retention enema of Zhuang medicine Anemone Tomentosa[J].Hunan Journal of Traditional Chinese Medicine,2019,35(06):55-56.DOI:10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2019.06.024.
[7] 王文杰，史宏，张静，等.壮药大火草抑制非细菌性前列腺炎模型大鼠炎症反应[J].现代免疫学，2021，41(06):504-508.DOI:10.35541/cjd.20201030.
WANG WJ, SHI H, ZHANG J, et al.Anemone tomentosa inhibits the inflammatory reaction in rats with nonbacterial prostatitis[J].Current Immunology,2021, 41(06):504-508.DOI:10.35541/cjd.20201030.
[8]钱余，钱小强，贡东卫，等. 白藜芦醇对前列腺炎大鼠模型前列腺组织中细胞因子的干预研究[J].中国男科学杂志，2017，31(3):14-18.DOI: 10.3969/j.issn.1008-0848.2017.03.003.
QIAN Y, QIAN XQ, GONG DW,et al. Effects of resveratrol on cytokines in prostatic tissue of chronic prostatitis rats[J].Chinese Journal of Andrology,2017,31(3):14-18.DOI: 10.3969/j.issn.1008-0848.2017.03. 003.
[9]郭健，胡冠宇，钱义明，等. 从miRNA-146a调控TLR-4/NF-KB通路探讨升降散保护大鼠脓毒症心肌机制的研究[J].中国急救医学，2018，38(05):431-436.DOI: 10.3969/j.issn.1002-1949.2018.05.013.
GUO J, HU GY,QIAN YM, et al. To investigate the mechanism underlying the protective effect of miRNA-146a on myocardial ischemia in sepsis by regulating TLR-4/NF-κB pathway[J]. Chin Journal Crit Care,2018,38(05):431-436.DOI: 10.3969/j.issn.1002-1949.2018.05.013.
[10]Zhang JZ, Liang CZ, Shang XJ, et al. Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome: A Disease or Symptom? Current Perspectives on Diagnosis, Treatment, and Prognosis[J].Am J Mens Health,2020;14(1):1557988320903200.DOI: 10.1177/1557988320903200.
[11]Khan FU, Ihsan AU, Khan HU, et al. Comprehensive overview of prostatitis [J]. Biomed Pharmacother,2017,94:1064-1076.DOI: 10.1016/j.biopha.2017.08.016.
[12]Franco JVA, Turk T, Jung JH, et al. Pharmacological interventions for treating chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome: a Cochrane systematic review[J].BJU Int,2020,125(4):490-496.DOI:10.1111/bju. 14988.
[13]孙自学，李鹏超.慢性前列腺炎的中医诊疗思路探析[J].辽宁中医杂志，2019，46(2):268-269. DOI:CNKI:SUN:LNZY.0.2019-02-016.
SUN ZX, LI PC.Diagnosis and treatment of chronic prostatitis in traditional chinese medicine[J].Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine,2019,46(2):268-269. DOI:CNKI:SUN:LNZY.0.2019-02-016.
[14]国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草[M].上海:上海科学技术出版社,1999:1768,3166.
[15]胡朝恩，艾智华.miRNA 调控炎症和免疫反应 TLR 信号通路的研究进展[J].西南军医，2015，17(1): 76-79.DOI: 10.3969/j.issn.1672-7193.2015.01.032.
HU CE, AI ZH. Advances in miRNA regulation of TLR signaling pathways in inflammation and immune response[J].Journal of Military Surgeonin Southwest China,2015,17(1):76-79.DOI:10.3969/j.issn.1672-7193. 2015.01.032.
[16]Dou Y, Tian X, Zhang J, et al. Roles of TRAF6 in central nervous system[J]. Curr Neuropharmacol,2018,16(9):1306-1313. DOI:10.2174/1570159X16666180412094655.
[17]张群燕，郭郡浩，蔡辉.肿瘤坏死因子受体相关因子 6 在 NF-κB 炎症通路中的研究进展[J]. 东南国防医药，2017，19(4):390-394. DOI:10.3969/j.issn.1672-271X.2017.04.014.
ZHANG QY,GUO JH,CAI H.Research progress of TUMOR necrosis factor receptor-associated factor 6 in NF-κB inflammatory pathway[J]. Military Medical Journal of Southeast China,2017,19(4):390-394. DOI: 10.3969/j.issn.1672-271X.2017.04.014.
[18]Sharma N,Verma R, Kumat KL, et al. miR-146a suppresses cellular immune response during Japanese encephalitis virus JaOArS982 train infection in human microglial cells[J]. J Neuroinflammation,2015,12: 30-40.DOI:10.1186/s12974-015-0249-0.
[19]杨永祥，崔效玮，叶玉勤，等.外泌体 miR-146a 对 N9 型小胶质细胞介导炎症反应的作用[J].中华神经外科疾病研究杂志，2018，17(6):500-503.DOI:CNKI:SUN:SJWK.0.2018-06-006.
YANG YX, CUI XW, YE YQ, et al.The effect of exosome derived miR-146a on the inflammation reaction mediated by the N9 type microglia[J].Chin J Neurosurg Dis Res,2018,17(6):500-503.DOI:CNKI:SUN:SJWK.0.2018-06-006.